

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-174685

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)7月6日

C 12 P 17/04

8931-4B ※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全6頁)

⑭ 発明の名称 微生物による光学活性 $\gamma$ -ラクトンの製法

⑮ 特 願 平1-199165

⑯ 出 願 平1(1989)7月31日

優先権主張 ⑰ 1988年8月4日 ⑱ イタリア(IT) ⑲ 67742A/88

⑳ 発 明 者 ロツサノ・カルデイロ イタリア国ミラノ、バイア・ビエトロ・ダ・コルトナ 7

㉑ 発 明 者 クラウディオ・フガン イタリア国ミラノ、バイア・ジー・ビー・ナザリ 8  
テイ

㉒ 発 明 者 ギセツベ・サセードテ イタリア国トリノ、バイア・エス・ビオ・ブイ 84

㉓ 発 明 者 マツシノ・パーベニ イタリア国トリノ、バイア・パレツティ 19

㉔ 発 明 者 パオロ・カベラ イタリア国トリノ、コルソ・ソメリアー 17

㉕ 出 願 人 ベルノド・リカルド フランス国75008パリ、ブルバード・ハウスマン 142

㉖ 代 理 人 弁理士 秋元 輝雄 外1名

最終頁に続く

#### 明 細 書

##### 1. 発明の名称

微生物による光学活性 $\gamma$ -ラクトンの製法

(1)  $\gamma$ -デカラクトンおよび $\gamma$ -オクタラクトンから選択された光学活性 $\gamma$ -ラクトンの製法であって該製法が、植物油、その加水分解生成物の一つ、またはリシノール酸を微生物育成培地と接触させる方法から成り、該微生物を *Aspergillus niger*, *Gluconobacter xyloperas*, *Phanerochaete chrysosporium*, および *Pichia etchellsii* から成る群から選択する製法。

(2) 該植物油を、蓖麻子油、カンフラワー油、ココナツ油から選択する請求項1記載の製法。

(3) *Gluconobacter xyloperas* とココナツ油を組み合わせて $\gamma$ -オクタノライドを生成させる請求項1記載の製法。

(4) リパーゼを用いて該植物油を酵素的に加水分解する請求項1および2記載の製法。

(5) c ヒドロキシデカン酸を酸性pHで加熱して

ラクトン化させる請求項1記載の製法。

(6) R- $\gamma$ -デカラクトンを酸性媒体から水蒸気でストリップして製造する請求項1記載の製法。

##### 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は光学活性 $\gamma$ -ラクトン、特に4-ヒドロキシデカン酸(4R)のラクトン( $\gamma$ -デカノライドまたは $\gamma$ -デカラクトン)および4-ヒドロキシオクタン酸(4R)のラクトン( $\gamma$ -オクタノライド)を微生物学的に作るための製法に関する。

〔従来の技術〕

これらのラクトン類は、揮発性であって、これらが天然食品のフレーバーを形成している点で極めて重要な物質である。

存在する量が微量なことから、これらを他の揮発性化合物から分離することは物理的に困難なので天然資源からこれらの化合物を抽出することは経済的ではない。

米国特許第4,580,858号公報には、

*Candida*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, および *Yarrowia* genus のある種のものがリシノール酸を酸化的に分解するという能力を見だし、リシノール酸の形態または蓖麻子油の形態でこれを培地に添加して、これにより外部リパーゼの存在下または非存在下で4-ヒドロキシデカン酸(4R)または対応するラクトンを直接に生成させる $\gamma$ -デカラクトンの製法を開示している。

$\gamma$ -ヒドロキシデカン酸は、リシノール酸を *Candida* genus に属する菌株で酸分解する際の中間物であるという事実は既に Okui らによりジヤーマナル・オブ・バイオケミストリー、54、538-540頁、1983 (J. Biochemistry) に発表されている。

米国特許第4,398,715号公報には、オクタ、ノナ、およびデカラクトンから成るフレーバーを *Pityrospora* genus の微生物培養により製造する方法が開示されている。

本発明の目的は、光学活性な $\gamma$ -デカノライドおよび/または $\gamma$ -オクタノライドの製法であっ

て、植物油、その加水分解生成物の一つ、および/または天然リシノール酸を微生物培地と接触させる方法から成り、該微生物を *Aspergillus niger* (CBS 102.12), *Cladosporium suaveolens* (CBS 157.58), *Phanerochaete chrysosporium* (CBS 57863), および *Pichia stipitis* (CBS 2011) からなる群から選択された微生物の育成培地と接触させて製造する方法を提供することにある。特に、 $\gamma$ -デカノライドの製造には蓖麻子油、サンフラワー油、これらの加水分解生成物の一つ、またはリシノール酸の使用が好ましい。

$\gamma$ -オクタノライドを製造するために *Cladosporium suaveolens* の育成培地と接触させるにはココナツ油の使用が好ましい。

本発明の方法を実施する際にサンフラワー油を使用することは該油が安価なので経済的に有利である。さらに有利な点は天然リシノール酸の使用であり、該酸は前記微生物に対して十分に無害であり、これらの微生物の代謝をなんら阻害しないことである。リシノール酸使用の特に有利な点

は、所望のラクトンの分離工程を酸性媒体中で実施すると分離が極めて簡単になる点にある。

各種の培養条件において比較的短時間で、例えば24時間と80時間の間で前記材料から所望ラクトンの生成が始まる。通常、これらの微生物は20~30℃の温度で上記材料と接触・保持される。

微生物を育成する栄養培地は公知のものが使用でき、後記する実施例に記述したようなものである。pre-接種材料として使用されるバイオマスの生産は攪拌下または非攪拌下でも生起するが、ラクトンが生成する分解工程については攪拌下で培養が起こり、所望する化合物の生成についてはGLC、TLC、HPLC、IRおよびNMRのような標準方法でモニターすることができる。分析により生成量が最大点に到達した時点で所望のラクトンを抽出する。公知[ILLFaberによる「オーガニック・ケミストリー」(Organic Chemistry) Vol. I, 427~428頁参照]のように、所望するラクトンに対

応する型の $\gamma$ -ヒドロキシ酸は酸性媒体中では容易に脱水環化した型のラクトンとして存在するので、ラクトンの抽出という意味は必然的に $\gamma$ -ヒドロキシ酸の対応ラクトンへの変換を意味する。

1) ラクトンを抽出するめに、培地をセライト(Celite)(R)で濾過し、酢酸エチルで洗浄して、pH5の酸性水相を酢酸エチルで好ましくは2回抽出する。併合した有機相は5%炭酸カリウム溶液で2回抽出して酸性部分を除く。炭酸ナトリウム上で乾燥した有機相は次いで蒸発し、蒸発残部を150℃/1~3mmHgで蒸留すると $\gamma$ -デカノライドまたは $\gamma$ -オクタノライドが得られる。

2) ラクトンの収率を向上させるために、この $\gamma$ -ヒドロキシデカン酸をpHを1~5とした酸性媒体中でラクトン化することもでき、この際には適当な酸を添加し酸性媒体を15~110℃、好ましくは90~100℃において2分ないし2時間(加熱温度に応じて)加熱してラクトン化する。ラクトンはこの酸性媒体から水蒸気によりス

トリップすることもできる。

#### [実施例]

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に述べる。生成ラクトン量はGLC分析から得られると同じ%で示した。

#### 実施例1

Aspergillus niger (CBS 102.12)の懸濁物を、2%メルク栄養素、0.02% Tween 80、およびリシノール酸5gを含みpH7の混合物を入れた300mlのエrlenマイヤーフラスコ中に接種した。該フラスコは予めオートクレーブ中で120℃で10分間滅菌したものである。このものを2~5日間27~30℃に維持し、完全に掻き混ぜた。この間に試料を採取し、エチルエーテルで試料を振ることにより得られた有機抽出液中のγ-デカノライドをGLCで測定した。得られたγ-デカノライド含有量は4%と12%の間であった。

#### 実施例2

Cladosporium suaveolens (CBS 157.58)を用

いる。この物質を気球型フラスコ中で蒸留したところ約350mgのγ-デカノライド、99.5% GLC、 $[\alpha]^{20}_D = +49$  (c1, メタノール)を与えた。

#### 実施例3

MPGA (20g/1モルトエキストラクト、5g/1ペプトン、20g/1グルコース、15g/1寒天)上に24℃で7日間育成したところのCladosporium suaveolensの試験管を、50mlのMPGB (20g/1モルトエキストラクト、5g/1ペプトン、20g/1グルコース、残部は水)を含む300mlのエrlenマイヤーフラスコ中に接種した。このフラスコを自動温度調節装置付きチャンバー中に30℃で放置し、2日間攪拌を維持した。このpre-接種材料は50mlのMPGB含有300mlフラスコをシードするのに用いた。各フラスコには5mlシードした。これらのフラスコを攪拌せずに30℃で4日間培養した。この時点で培地を100mlのミートエキストラクト(20g/1)、5gのリシノール酸

いた以外は実施例1の操作を繰り返した。得られたγ-デカノライド含有量は4%と10%の間であった。

#### 実施例3および4

リシノール酸の代わりに8gの蓖麻子油を使用し以外は実施例1および2の操作を繰り返した。

両方とも4日間の培養後に約5%のγ-デカノライド含有物が得られた。

#### 実施例5：分離方法

全て25gのリシノール酸を用いた五つのエrlenマイヤーフラスコで実施例1と2に記載の操作を繰り返し、48時間後に培養物をCellite上で濾過し、該Celliteを酢酸エチルで洗浄した。

pH5の水相を酢酸エチルで2回抽出した。このCellite有機抽出物と洗浄相(220ml)とを5%炭酸カリウム溶液150mlで2回抽出した。この有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥し、蒸発乾固した。TLCによればγ-デカノライドの存在が確認され、さらにもっと流動性の生成物の存在を認めた(7部ヘキサン溶剤、3部酢酸エ

チル)。この物質を気球型フラスコ中で蒸留したところ約350mgのγ-デカノライド、99.5% GLC、 $[\alpha]^{20}_D = +49$  (c1, メタノール)を与えた。

γ-デカノライドの生成は2、3、4、5、および7日後継続的に抽出を行ってモニターした。

4日後の抽出：粗抽出物重量3g、

GLC分析：γ-デカノライド20%  
蒸留分離したγ-デカノライド：0.6g

5日後の抽出：粗抽出物重量3g、

GLC分析：γ-デカノライド17%

7日後の抽出：粗抽出物重量3g、

GLC分析：γ-デカノライド17%

#### 実施例7

MPGA試験管から2日間育成させたところのCladosporium suaveolensを、100mlのミートエキストラクト培地(5g/1)と0.2% Tweenから作った100mlの培地を含む300mlのエrlenマイヤーフラスコ中に接種した。攪拌下で30℃で2日間育成した。

この時点で、1 m l のリシノール酸を加えたところ、pH は 8.5 となった。この混合物を 30℃ で 18 日間攪拌した。40% の $\gamma$ -デカノライドを含む 1.1 g の粗抽出物が四つのフラスコ (5 g のリシノール酸に該当) から得られた。

#### 実施例 8

試験管から *Gladosporium suaveolens* の接種材料を、ミートエキストラクト (5 g/l) および 0.2% Tween および 1 g のリシノール酸 (全て滅菌済み) から成る培地を含む 300 m l エルレンマイヤーフラスコに添加した。攪拌下 30℃ で 9 日後、pH は 8.5 となった。二つのフラスコ (2 g のリシノール酸に該当) の内容物を抽出して 82%  $\gamma$ -デカノライド含有粗抽出物 0.33 g を得た。

#### 実施例 9

培地を 100 m l のミートエキストラクトで置換するまでの操作を実施例 8 について繰り返した。この時点でリシノール酸の代わりに 5 g のサンフラワー油と 0.2% Tween を添加した。

酸に該当) を抽出した。粗抽出物を気球型フラスコで蒸留して 0.18 g の $\gamma$ -デカノライドを得た。

9 日後、四つのフラスコ (20 g のリシノール酸に該当) を抽出した。粗抽出物 4.4 g を得た。この物質 2.2 g を気球型フラスコで蒸留して $\gamma$ -デカノライド (43%) 0.1 g を得たが、蒸留以前の粗抽出物中には 4.4% の $\gamma$ -デカノライドが含まれていた。

15 日後に四つのフラスコを抽出した。粗抽出物をヘキサンに溶解し 1:1 メタノール/5% 炭酸カリウムで抽出した。ヘキサン層を濃縮したところ 12% ラクトンを含む生成物 1 g が得られた。

#### 実施例 11

ミートエキストラクト (20 g/l)、0.2% Tween および 2 g のリシノール酸から成る培地 100 m l を含む 300 m l のエルレンマイヤーフラスコ (何れも滅菌済み) を、実施例 10 記載の pre-培養から 5.108 セル/ml の

混合物を攪拌し 15 日後に抽出した。

粗抽出物: 2.8 g; % ラクトン: GLC 31% (ラクトン化後で 38%)

この物質を 150℃/2 mm Hg で蒸留して 0.350 g の純 $\gamma$ -デカノライドを得た。

#### 実施例 10

100 m l の栄養素ブロス (20 g/l)、0.2% Tween および 5 g のリシノール酸を含む 300 m l エルレンマイヤーフラスコを、GYP (50 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキストラクト、10 g/l ペプトン) 上で 24 時間育成させた *Pichia etchellsii* (CBS 2011) から成る接種材料でシードした。この pre-接種材料を試験管から MPGA 上に接種した。内容物を 24℃ で 2 日間育成させた。pH は 8 であった。

この混合物を 30℃ で攪拌下で育成し; 8 日後二つのフラスコ (10 g のリシノール酸に該当) を抽出した。粗抽出物の重量は 7 g であり、3.8% の $\gamma$ -デカノライドを含んでいた。

7 日後に二つのフラスコ (10 g のリシノール

*Pichia etchellsii* を接種した。

30℃ で攪拌下 5 日後リシノール酸 2 g に相当する一つのフラスコを pH 3 に酸性化し 100℃ に加熱した。

2 時間蒸留を継続して凝縮水をヘキサンで抽出したところ 0.2 g の R- $\gamma$ -デカノライドを得た。

#### 実施例 12

ミートエキストラクト (5 g/l)、0.2% Tween および 1 g のリシノール酸 (全て予備滅菌済み) から成る培地 100 m l を含む 300 m l のエルレンマイヤーフラスコを、試験管から直接に *Pichia etchellsii* を接種した。

2 g のリシノール酸に相当する二つのフラスコを 2 日後に抽出した。粗抽出物の重量は 0.32 g であり、23% の $\gamma$ -デカラクトンを含有していた。5 日後にさらに二つのフラスコを抽出し、粗抽出物 0.38 g、5.3% の $\gamma$ -デカノライドを含有したものが得られた。

#### 実施例 13

ミートエキストラクト(5g/l)、0.2% Tweenおよび1gのココナツ油(γ-オクタノライドを含まない)(全て予備滅菌済み)から成る培地100mlを含む300mlのエrlenmeyerフラスコに Cladosporium sphaerulans を試験管から直接接種した。5日後に抽出を実施して約100mgのγ-オクタノライドを得た。

代理人 秋元 輝雄  
外1名

第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 P 17/04  
C 12 R 1:685)  
(C 12 P 17/04  
C 12 R 1:645)  
(C 12 P 17/04  
C 12 R 1:84)

⑦発明者

フランセスコ・スカル  
シア

イタリア国ボローニャ、バイア・タグリアコツツイ 9

手続補正書(方式)

平成1年12月27日

特許庁長官 殿  
(特許庁審査官 殿)

1. 事件の表示

平成1年 特 許 願 第 199165 号

2. 発明の名称

微生物による光学活性アラクトンの製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 ベルノド・リカルド

4. 代理人

住 所 東京港区南青山一丁目1番1号

〒107 電話 475-1501 (代)

氏 名 (6222) 井理士 秋 元 郎

住 所 同 所

氏 名 (1815) 井理士 秋 元 不二

5. 補正命令の日付( )

(発送日) 平成1年11月28日

6. 補正の対象

発明の名称

特許請求の範囲の欄

7. 補正の内容

(1) 発明の名称を「微生物による光学活性アラクトンの製法」と訂正する。

(2) 明細書第1頁3行目と4行目の間に「2. 特許請求の範囲」を挿入する。

方式  
審査

